

消化器癌における候補癌抑制遺伝子NDRG2のエピジェネティックな発現制御機構の解析

著者	山村 明寛
号	80
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	医博第2910号
URL	http://hdl.handle.net/10097/62197

氏 名	やまむら あきひろ 山村 明寛
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	消化器癌における候補癌抑制遺伝子 <i>NDRG2</i> のエピジェネティックな発現制御機構の解析
論文審査委員	主査 教授 佐々木 巖 教授 堀井 明 教授 下瀬川 徹 教授 五十嵐 和彦

論文内容要旨

【はじめに】N-myc downstream regulated gene 2 (*NDRG2*) は正常ヒトでは脳、脊髄、骨格筋、心臓、唾液腺で高発現し、細胞の分化・発生、ストレス応答、神経細胞分化、シナプス形成、軸索構築への関与、鉱質コルチコイドによる腎集合管における Na 代謝への関与など、多くの生体内作用を行っている。近年 *NDRG2* は様々な癌腫で発現低下が報告されており、新規癌抑制遺伝子の候補と考えられている。しかし、発現抑制機序や発癌機構はいまだ十分に解明されていない。

【研究目的】大腸癌、胃癌、膵癌において、35 種の消化器癌細胞株および 111 例の臨床切除標本を用いて、mRNA およびタンパク質レベルでの *NDRG2* 発現を解析する。また、これまで報告の少ない膵癌においては、*NDRG2* 発現と臨床病理学的因子、さらに予後との相関を解析する。さらに、*NDRG2* 発現低下機序として、プロモーターメチル化の関与を中心に解析し、発現抑制メカニズムを探る。

【材料と方法】大腸癌 20 種、胃癌 6 種、膵癌 9 種の癌細胞株を用いた。臨床切除標本は 111 例（大腸癌 25 例、胃癌 17 例、膵癌 69 例）を用いた。これらの検体において、定量 RT-PCR、ウェスタンブロッティング、および免疫組織化学染色により *NDRG2* の発現を確認した。また、メチル変換酵素阻害剤またはヒストン脱アセチル化酵素阻害剤処理による発現回復を観察し、エピジェネティックな発現抑制機構の関与を検討。さらに、バイサルファイトシークエンス解析およびメチル化特異的 PCR を中心に、メチル化の関与を解析した。

【結果】35 種の細胞株において、*NDRG2* の発現は正常粘膜に比較し、さまざまなレベルに抑制さ

れていた。さらに臨床切除標本において、*NDRG2* の発現を免疫組織化学染色にて解析すると、大腸癌 20 例中 19 例、胃癌 17 例中 14 例、膵癌 69 例中 68 例において、正常部に比較し癌部で有意に発現が低下していた。さらに膵癌において、*NDRG2*-陰性群は *NDRG2*-陽性群に比較し有意に予後が不良であった ($P=0.04$)。次いで、*NDRG2* 低発現細胞株をメチル変換酵素阻害剤またはヒストン脱アセチル化酵素阻害剤で処理すると、*NDRG2* の発現が有意に回復し、このことよりエピジェネティックな機構が *NDRG2* の発現抑制に関わっていると考えられた。メチル化解析に先立って行った、*NDRG2* の転写開始点の検索では、*NDRG2* の消化器組織における転写は 2 つある転写開始点のうち、エクソン 2 より主に転写を行っていることが分かった。さらに、メチル化解析として行ったパイサルファイトシーケンス解析により、このエクソン 2 周囲のプロモーターのメチル化が *NDRG2* の転写抑制に強い影響を与えていることが明らかとなった。臨床切除標本において、このエクソン 2 のプロモーター領域を、メチル化特異的 PCR にて解析すると、大腸癌では 22 例中 6 例、胃癌では 10 例中 4 例、膵癌では 22 例中 1 例にメチル化が認められた。また、CpG アイランドメチル化形質 (CIMP) 特異的マーカーのメチル化と *NDRG2* のメチル化の相関関係より、*NDRG2* のメチル化は消化器癌の発生や進行に影響を与えるのに必要な変化である (メチル化は発癌に対し “driver” として機能する) と考えられた。

【結語】本研究では、*NDRG2* は癌抑制遺伝子の候補であると考えられ、さらに、*NDRG2* の発現低下は、膵癌において予後不良因子であることを明らかにした。また、プロモーターメチル化やヒストン修飾のようなエピジェネティックな機構が転写抑制に関与しており、とくに TSS Type II のプロモーターメチル化が、大腸癌、胃癌における *NDRG2* 発現抑制の中心であり、膵癌においてはヒストン修飾が *NDRG2* の発現抑制を来す重要な機序であることが示唆された。今後さらに機能解析などを行っていくことで、*NDRG2* は癌の診断や治療において新しい、そして有力な分子マーカーとなっていくものと考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

博士論文題名 消化器癌における候補癌抑制遺伝子 *NDRG2* のエピジェネティックな発現制御機構の解析

所属専攻・分野名 医科学 専攻 生体調節外科学 分野

学籍番号 氏名 山村 明寛

エピジェネティクスによる遺伝子発現調節は正常細胞の発生および維持に必要不可欠であるが、各種癌における癌抑制遺伝子のエピジェネティックな発現抑制は、発癌および癌進展において重要な役割を行っており、近年さまざまな研究が進められている分野である。

本論文では、新規癌抑制遺伝子として種々の癌腫において発現抑制が報告されている N-Myc downstream regulated gene 2 (*NDRG2*)に着目し、大腸癌、胃癌、膵癌といった消化器癌における発現を、細胞株および臨床切除標本を用いて解析し、さらに、メチル化およびヒストン修飾といったエピジェネティクスによる機序がその発現抑制に関与していることを明らかにした。まず、各種癌細胞株では、発現がさまざまなレベルに発現抑制されていることを示し、さらに臨床切除標本において正常部に比較して癌部で有意に *NDRG2* の発現が低下していることを示した。特に、膵癌における *NDRG2* の発現低下が、予後不良因子となりうることは、これまでに報告のない新たな知見であり、特筆に値する。また、*NDRG2* のメチル化解析を行うにあたって行った転写開始点の検索にて、消化器組織における *NDRG2* の転写が、エクソン 2 より行われていることを初めて明らかにした。その後に行ったメチル化解析でも、特に大腸癌、胃癌においてはこのエクソン 2 のプロモーターメチル化にて *NDRG2* の発現が制御されていることを示した。この結果は、*NDRG2* のメチル化による発現抑制が、これまでエクソン 1 周囲のメチル化解析のみでしか報告されていなかったことに対し、新たなメチル化制御領域を明らかにしたという点で、価値ある結果である。このメチル化が癌進展にとって必要なメチル化であるか否かについても、CIMP との相関を示すことで、癌進展に重要である可能性を示唆させた。また、膵癌においてはヒストン修飾が *NDRG2* の発現抑制に関与している可能性を示した。

この研究は、新規癌抑制遺伝子としての可能性が報告されてきている *NDRG2* に関して、消化器癌における発現低下を改めて証明し、さらに発現抑制機序に関しては未だ一定の見解のなかった *NDRG2* に関して、エピジェネティクスによる発現抑制機序の関与の可能性を示した。以上のように、本論文は新知見に富み、その論旨も論理的、化学的である。

よって、本論文は東北大学大学院博士(医学)の学位論文として値するものである。